

# ヒト血漿におけるTAMe esterase活性の測定法について

著者	熊谷 直史
号	497
発行年	1968
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/18466">http://hdl.handle.net/10097/18466</a>

氏 名 ( 本 籍 )                      くま                      がい                      なお                      ふみ  
熊                      谷                      直                      史

学 位 の 種 類                      医                      学                      博                      士

学 位 記 番 号                      医                      博                      第                      4                      9                      7                      号

学位授与年月日                      昭 和   4   3   年   3   月   2   6   日

学位授与の要件                      学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専門課程                      東北大学大学院医学研究科  
( 博士課程 ) 内科学専攻

学位論文題目                      A colorimetric method for the estimation  
of TAME esterase activity in human  
plasma.  
( ヒト血漿における TAME esterase 活性の  
測定法について )

( 主 査 )

論文審査委員 教授 鳥 飼 龍 生 教授 菊 地 吾 郎

教授 吉 沢 善 作

## 論 文 内 容 要 旨

p-tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (以下TAMe)は kallikrein, plasmin, trypsin, thrombin, permeability factor, Hageman factor, complement, cathepsin などによつて分解されることが知られており, これらの酵素を総称して, TAMe esterase という。以上の酵素が諸種の疾患において, 重要な病因的役割を果していることは, 諸家の報告しているところである。血中における TAMe esterase 活性の測定法には, Ronwin, Sardesai, Siegelman, 等の方法があるが, いずれも操作が複雑であり, 且つ再現性に乏しい。そこで著者は新たに, 臨床検査に適していると考えられる一方法を考案し, 併せて正常者血漿における TAMe esterase 活性を測定した。

### 方 法

原理は一定量の TAMe と血漿とを  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間 incubate したのち, 分解されずに残つてゐる TAMe に alkaline hydroxylamine を反応させて hydroxamic acid をつくらせ, 之に  $\text{FeCl}_3$  を加えて ferric complex をつくり発色させる。この吸光度を測定し, 各濃度の TAMe について作製した標準曲線に对照して TAMe の量に換算してから, 分解された量を計算した。活性は 1 ml の血漿によつて 1 時間で分解された TAMe の量, すなわち  $\mu\text{M}/\text{ml}/\text{hr}$  で表した。

(1) シリコン処理した注射器で空腹時ヘパリン採血し, 2500 回転で 10 分間遠心し, 血漿を分離する。

(2) 試験管に 0.1 M tris buffer pH 8.0, 1 ml 及び 0.06 M TAMe 液 1 ml を加えよく混合してから  $37^{\circ}\text{C}$  で 5 分間 incubate する。

(3) 血漿 1 ml を加え, 充分に混合してから試験管 A), B) に 1 ml ずつとる。

(4) 試験管 A) は zero time sample とし, 直ちに次の段階へ。試験管 B) は  $37^{\circ}\text{C}$  で正確に 1 時間 incubate する。(この段階まで, すべての器具はシリコン処理したものをを用いる。)

(5) Alkaline hydroxylamine 液 2 ml を, 試験管 A) 及び B) に加えよく振盪し室温にて 25 分間放置する。

(6) 6% trichloroacetic acid 液 1 ml を加えて反応を中止させ, 出来た沈澱物を濾過して除蛋白する。

(7) 各濾液 1 ml に 0.11 M ferric chloride 液 4 ml を加え, 褐色に発色せしめる。

(8) Beckman spectrophotometer を用い, 波長  $510\text{m}\mu$  で 0.11 M ferric-

chloride液をblankとし各吸光度を読む。

- ⑨ TAME各濃度について作製した標準曲線に对照して、 $\mu\text{M}$ に換算し次式より求める。

$$\text{TAME esterase activity } \mu\text{M/ml/hr} = (\text{micromoles in tube A} - \text{micromoles in tube B}) \times 3$$

本法により正常者30例のTAME esterase活性を測定したところ、 $9 \sim 34 \mu\text{M/ml/hr}$ であつた。

以上のような測定条件を定めるに当つて種々の検討を行なつた。

### 実験方法に関する考察

- ① TAME esterase活性に及ぼすpHの影響。

活性はpH 8.0で最も高く、それよりも低いpH 7.0, 7.5及び高いpHすなわちpH 8.5では急激に減じた。

- ② TAME esterase活性に及ぼすincubation温度の影響。

20℃, 37℃及び50℃で検討してみた。37℃及び50℃で活性は強く20℃では最も低かつた。37℃及び50℃ではあまり差がなかつたが、生理的条件を考慮して37℃で測定することにした。

- ③ TAME esterase活性に及ぼすincubation時間の影響。

30分から120分までの種々の時間incubateしてみたが、時間に比例して分解されたTAMEの量も多くなつた。Incubation時間は便宜上1時間とした。

- ④ 血漿の使用量。

血漿を0.2 mlより1 mlまでの種々の量使用して検討したが、1 mlの血漿がTAMEを8割程度分解する場合には、血漿を希釈して再検討する必要があると考えられた。

- ⑤ TAME液の濃度について。

12～72  $\mu\text{M/ml}$ までの種々の濃度の溶液を用い、血漿1 mlとincubateしたところ、12～60  $\mu\text{M/ml}$ まで略分解されるTAMEの量も濃度が濃くなるにつれて多くなつたが、60と72  $\mu\text{M/ml}$ 溶液との間では殆んど差がなく、60  $\mu\text{M/ml}$ で分解されるTAMEの量がピークに達したと考えられた。

- ⑥ 分解産物の活性に及ぼす影響。

TAMEは分解されると、p-tosyl-L-arginine及びmethyl alcoholを生ずる。併しながら、これらの物質は60  $\mu\text{M/ml}$ までの濃度ではTAME esterase活性に影響を与えなかつた。

更にkallikrein-inhibitorとして知られているtrasylolを正常者血漿に加えたのち、TAME esterase活性を測定したが、その値には殆んど差がなく、したがつて、正常者の血漿におけるTAME esterase活性はkallikreinに基づいているのではないことが判明した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

最近の酵素学の進歩に伴つて臨床的にも種々の酵素の病因的役割が解明されてきている。

血中 esterase のうち p-tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME) を基質として測定されるものには kallikrein, plasmin, permeability factor, Hageman factor, trypsin, thrombin, Complement, Cathepsin などが含まれるが、これら一連の酵素が諸種疾患において果す役割についても種々検討されている。しかしこれまでこのヒト血中における TAME esterase 活性の測定は、血漿または血清を TAME と一定条件で incubate したのち、①分解されて生じた methyl alcohol を formaldehyde に変える、②生じた tosyl-L-arginine を Cu と結合させて Cupric complex を作らせる、などの方法により行なわれていたが、いずれも操作が複雑で時間がかかり、再現性に乏しく、不正確であつた。著者は、TAME が alkaline hydroxylamine と反応して hydroxamic acid をつくり、これが  $\text{FeCl}_3$  と ferric complex を形成して発色する性質を利用して、ヒト血漿における TAME esterase 活性の新らしい測定法を考案した。この際著者は測定の各段階について検討を加えた結果、TAME と alkaline hydroxylamine との反応は 25 分を要し、生じた ferric complex の吸光度は波長  $510m\mu$  および pH 1.2 で最大となること、さらに TAME esterase 活性の至適 pH は 8.0 至適温度は  $37^\circ\text{C}$  であることを確かめた。また血漿と基質との量の関係についても検討を加えた。以上の方法により正常者 30 例の活性を測定し、 $9 \sim 34 \mu\text{M}/\text{ml}/\text{hr}$  の値を得た。更に特異的 kallikrein-inhibitor である trasylol を用い、正常血漿における TAME esterase 活性が kallikrein に基づいているのでないことを確かめた。本法は操作が容易で短時間で実施でき、正確かつ再現性を有している。本酵素の諸種疾患における病因的役割を解明する方法として、本法は鋭敏で実施しやすい一つの新らしい手段を加えたものである。

よつて本論文は学位を授与するに値するものと認める。